

Fiche compte-rendu semestriel d'activité

Date : 09/07/2007

Réf.: ANR/

Nombre de pages : 4

Tâches	2007	2008		2009	2010	Commentaires
		S1	S2	S1/S2		
QTL analysis on PB260 x MDF180 (French Guiana pop.)		⌘	⌘	/ Δ		Détection de QTL sur MDF180 réalisée sur carte SSR préliminaire ; à finaliser sur carte SSR + AFLP
DNA extraction and paternity testing on new progenies			⌘	⌘ /		Trois nouvelles descendance pour carto. : descendants supplémentaires de PB260 x FX2784 de PEM ; desc. sup. de PB260 x MDF180 de PMB ; nouveau croisement (Sensible x Résistant = WxR) de PMB W x FDR5597 Envoi de feuilles à Montpellier (09/08, 03/09 et 05/09) extractions ADN de 747 descendants et tests de paternité réalisés sur 539 certifiés légitimes à 99 % par SSR
SSR mapping on PB260 x MDF180 (PMB pop.) and on WxR5597 progeny				/ Δ	▲	100-200 SSR à génotyper par descendance ; 15 SSR génotypés
QTL analysis on 3 progenies				/ Δ	Δ	PB260xRO38 ; PB260 x MDF180 (population PMB) ; WxR5597
(Fine)-mapping of SSR on PB260 x FX2784 (PEM pop.)			⌘	⌘ /		Génotypage de 12 marqueurs SSR au lieu de 8, réalisé plus tôt que prévu sur 284 descendants légitimes ; évaluation complémentaire de la résistance au champ en cours (PEM)
Cirad + Michelin (Montpellier) : sous projet 3 (Gènes candidats)						
EST-SSH libraries related to the RO38 resistance: DNA sequencing and data mining	(⌘)	⌘	⌘	⌘ /		9216 clones d'EST de 6 banques SSH produits et séquencés (V. Pujade-Renaud, Cirad, Montpellier). Data mining : voir ci-dessous.
EST-SSH libraries related to the RO38 resistance: expression analysis		⌘	⌘	⌘ / Δ		Analyse par macro-arrays ; maîtrise de la technique et réalisation d'un premier lot de membranes et d'hybridations (stage de M2 de M. Déon) ; poursuite de l'analyse par A. Berger (UMR-dap) : nouvelles membranes et hybridations ; analyse de données en cours.
EST-SSH libraries related to the MDF180 resistance: data mining		⌘	⌘	⌘ /		6959 séquences d'EST de 4 banques SSH fournies par l' UESC (D. Garcia, Brésil) ; data mining de l'ensemble des 15515 séquences produites à l'UESC et à l'UMR-dap : set unigène de 6992 séquences
EST-SSH libraries related to the MDF180 resistance: results of expression analyses				⌘ / Δ		Séquences produites à l'UESC et membranes haute densité produites au CENARGEN (Brasilia) par D. Garcia. Analyse d'expression par hybridation faite à Montpellier (UMR-dap). Les gènes candidats identifiés seront mis à disposition du projet.
Cirad + Michelin (Montpellier) : sous projet 2 (Développement de marqueurs)						
Search for SSR sequences in ESTs; test for polymorphic PCR markers		⌘	✖	⌘ / ▲		Analyse d'EST d'hévéa disponibles dans EMBL réalisée ; tests de polymorphisme sur 2009 (stage M2 de K. Bouchata

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

Tâches	2007	2008		2009	2010	Commentaires	
		S1	S2	S1/S2			
Search for polymorphic markers in candidate ESTs				⌘ / Δ	Δ	Recherche de SSR dans les EST ou dans les BAC-ends (BES) et de SNP (HRM, séquençage Sanger...)	
Map integration of candidate ESTs				/ Δ	Δ		
Cirad (Kourou, Guyane) :							
Resistance evaluation of the 300 additional PB260xRO38			✖	/ Δ	▲	Evaluation de la Résistance (R) au champ des 118 F1 PB260xFX2784 réalisée antérieurement ; tests R en conditions contrôlées sur ces descendants remplacés par tests sur 196 F1 PB260xMDF180, en cours à Kourou, à l'aide d'une souche équatorienne de <i>M. ulei</i> => tests sur PB260xRO38 reportés en années 2-3.	
Resistance evaluation of the 118 F1 PB260xFX2784	(⌘)				✖		
<i>Resistance evaluation of 196 F1 PB260xMDF180</i>			⌘	⌘ / ▲			
Michelin (Plantation Edouard Michelin - PEM, Plantation Michelin de Bahia - PMB, Brésil) :							
Crosses by hand pollinations, Brazil			⌘	/ Δ			
Filed resistance evaluation of 3 progenies: PB260xFX2784 (PEM), PB260xMDF180 and Wx FDR5597 (PMB)	(⌘)	⌘	⌘	⌘ / Δ	Δ	Voir ci-dessus "Paternity testing"	
Δ	Prévu	▲	Reprévu	✖	Abandonné	⌘	Réalisé

Indiquer les dates des réunions des projets :

* Ce tableau décrit les principales tâches et livrables du projet qui ont été définis lors du démarrage du projet.

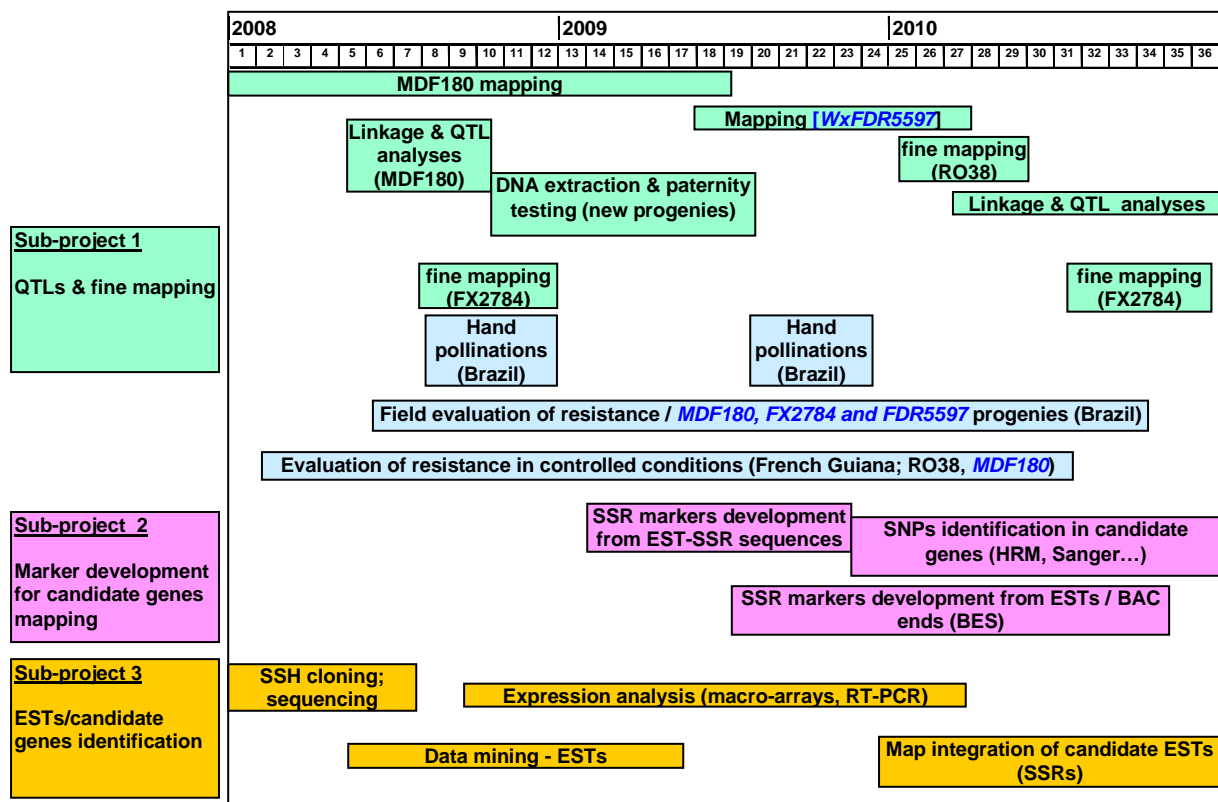
Fiche compte-rendu semestriel d'activité

Date : 09/07/2007

Réf.: ANR/

Nombre de pages : 4

Updated work plan (December 2008)



	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

C. Retombées cumulées sur la durée du projet

Cette section rassemble des éléments cumulés qui seront suivis tout au long de l'avancée du projet et repris dans son bilan. Ils permettent d'apprécier l'impact du programme à différents niveaux. Cette section est constituée d'un tableau des publications¹, et d'une liste de résultats éventuellement plus qualitatifs.

Nombre de publications et de communications cumulées sur la durée du projet.

Faire la séparation des actions impliquant un seul partenaire et celles résultant d'un travail en commun (« multipartenaires »)

	International		France		Actions de diffusion		
	Articles acceptés dans des revues à comité de lecture	Communications Internationales	Articles France	Communications France	Articles vulgarisation	Conférences vulgarisation	Autres
Mono-partenaires							Déon Marine (2008) <i>Rapport de stage de Master M2 Professionnel</i> , Univ. Montpellier II & Montpellier SupAgro, 39p.
							Le Guen Vincent (2008) <i>Thèse de doctorat</i> , Univ. Montpellier II & Montpellier SupAgro, 186p.
		Prévu : Le Guen et al. « Analyse QTL de la résistance de MDF180 » PGEM8, Lisbonne, 10/09 (Poster)					
Multi-partenaires				Seguin et al. (2008) Présentation du projet GENESALB. Séminaire Génoplante, Arles 2008: Poster			

¹ La date de référence est la date de fourniture du rapport.

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

Autres retombées (voir en particulier celles annoncées dans l'annexe technique) :
Cette liste inventorie les brevets nationaux et internationaux, licences, et autres éléments de propriété intellectuelle consécutifs au projet, du savoir faire, des retombées diverses. . Elle en précise les partenariats éventuels.

Nature	Commentaire
Carte de 177 SSR de PB260xMDF180	Destiné au domaine public
Deux QTL majeurs identifiés chez MDF180 en Guyane	Destiné au domaine public
9120 séquences d'ESTs exprimés en relation avec la résistance/sensibilité (SSH)	Destiné à terme au domaine public ; accès restreint aux partenaires du projet jusqu'à analyse complète des séquences
1 set de 6992 unigènes issus de la compilation des banques EST du Cirad et de l'UESC	Destiné à terme au domaine public ; accès restreint aux partenaires du projet jusqu'à analyse complète des séquences

D. Faits marquants du semestre écoulé (principaux résultats)

Réunion du Comité de Pilotage (CP) : conformément à ce qui avait été annoncé dans le précédent compte-rendu semestriel, une réunion du CP a eu lieu au Brésil à l'occasion de la réunion annuelle du comité technique du projet Cirad – Michelin - Brésil/CMB (2-6 Mars 2009).

La prochaine réunion du CP aura lieu à Clermont-Ferrand fin Septembre 2009.

1- Extraction d'ADN des descendance de cartographie (sous projets 1 & 2):

Un premier envoi de feuilles depuis les plantation PEM et PMB au Brésil avait été fait en Septembre 2008. L'extraction d'ADN et les tests de paternité par marqueurs SSR ont été réalisés au 2^{ème} semestre 2008 à Montpellier, confirmant la légitimité des descendance du projet. L'expédition de feuilles à Montpellier a été complété et achevé par 2 envois complémentaires en Mars et Mai 2009 correspondant aux descendants de PMB restant à analyser. L'extraction d'ADN de la totalité de ces échantillons a été achevée au mois de Juin et les tests de conformité seront réalisés en Juillet.

2- Développement de marqueurs EST-SSR (sous projet 2) :

L'objectif est la cartographie de gènes candidats grâce au polymorphisme de longueur de motif SSR présents dans les séquences d'EST d'hévéa. Deux sources de séquences ont été exploitées : celles disponibles dans les bases de données internationales (EMBL/Genbank) et celles produites dans le projet à partir des 6 banques SSH PB260 vs RO38 (V. Pujade-Renaud). De ces séquences ont été extraites celles qui à la fois présentaient un motif SSR et dont la fonction putative était associée aux caractères de résistance et de défense chez les

plantes. L'identification de la fonction putative des enzymes codées par ces EST a été réalisée en utilisant la fonction blastx, via le logiciel ESTtik (X. Argout, Cirad), et l'analyse complémentaire de « Gene Ontology » à l'aide du programme Blast2GO. Les amorces PCRR ont été définies et commandées pour 29 gènes/séquences issues de EMBL et pour 72 séquences issues des banques SSH PB260 vs RO38. Les tests de polymorphisme et la cartographie des EST-SSR polymorphes font l'objet du stage de Master M2 de Karima Bouchata (Mai-Septembre 2009) encadrée par V. Pujade-Renaud et M. Seguin.

3- Recrutement chercheur post-doctorant (sous-projet 2) :

Conformément au calendrier prévu, un chercheur post-doctorant (Philippe Cubry) a été recruté par Michelin à compter du 1^{er} Juillet 2009. Ce CDD de 18 mois s'achèvera donc à la date de fin du projet GENESALB (31/12/10). Ce chercheur aura en charge la conduite de la partie principale des activités du sous-projet 2 (Intégration des gènes candidats dans la(les) carte(s) construites ou utilisées dans le projet. Il s'agit de développer différentes techniques (EST-SSR, HRM, BES-SSR...) permettant de transformer les séquences des EST, définis comme candidats dans le sous projet 3, en marqueurs génétiques et de les cartographier dans une ou plusieurs descendance(s) du projet.

E. Description des travaux effectués et résultats obtenus pendant la période concernée. Conformité de l'avancement des travaux avec le plan initialement prévu. Prévision de travaux pour la (les) prochaine(s) période(s). Eventuellement, difficultés rencontrées et solutions de remplacement envisagées (15 lignes maximum) ex : impasse technique, abandon d'un sous traitant, maîtrise des délais, maîtrise des budgets. Faut-il revoir le contenu du projet ? Faut-il revoir le calendrier du projet ?

- 1- Génotypage AFLP de la descendance PB260xMDF180 de Guyane (S. Espéout, M. Seguin / sous-projet 1). Les 351 descendants ont été génotypés à l'aide de 11 couples d'amorces AFLP, fournissant 212 marqueurs dont 110 hétérozygotes chez PB260 et 120 chez MDF180. L'intégration de ces marqueurs dans la carte SSR est en cours à l'aide du logiciel JoinMap 3.
- 2- Envoi de feuilles (1 feuille par descendant, 3 feuilles pour chaque parent) du Brésil à Montpellier (09/08) et extraction d'ADN (C. Mattos, S. Espéout, V. Le Guen / sous-projet 1). Les extractions d'ADN à partir du premier lot de feuilles avait été faites à l'aide d'un protocole simplifié (broyeur à billes MM300 Qiagen). Le taux de légitimité de ce matériel étant de 98 à 100 %, les extractions à partir des feuilles des envois suivants ont été réalisés à l'aide du protocole standard au MATAB), plus lent mais fournissant la quantité nécessaire d'ADN pour toute la durée du projet et au-delà. Les ADN des échantillons de PMB précédemment extrait au broyeur ont également fait l'objet d'une nouvelle extraction au MATAB. L'opération de cartographie de la

descendance PB260 x FX2784 de PEM étant terminée, ces échantillons n'ont pas fait l'objet d'une nouvelle extraction. Au total 463 extractions d'ADN de descendants de cartographie ont été réalisées. Quatre-vingt-quatorze descendants ne présentaient pas de feuilles disponibles à PMB lors des différents envois. Compte tenu du taux de légitimité estimé sur le premier envoi, l'effectif des descendance est suffisant. Il ne sera pas procédé à des envois complémentaire et l'opération d'extractions d'ADN est achevée.

- 3- Poursuite de l'analyse bioinformatique / « data mining » (X. Argout, D. Garcia, V. Pujade-Renaud / sous-projet 3) des EST issues des banques SSH PB314 vs. MDF180 (D. Garcia) et PB260 vs RO38 (V. Pujade-Renaud). Les « sets unigènes » ont été définis pour chacune des banques individuellement ainsi que pour l'ensemble des 15 515 séquences : 6692 unigènes ont été produits dans le cadre du projets. La comparaison des différentes banques révèle un nombre réduit de séquences communes aux différents traitements ou aux différents génotypes (voir compte-rendu de la réunion du CP de Mars 2009). Ceci serait dû à la taille réduite des séquences EST mais implique que la possibilité d'identification de SNP, par alignement de séquences communes aux différents génotypes, sera limité. La recherche de SNP se fera par analyse HRM et séquençage d'allèles amplifiés (post-doc de P. Cubry).
- 4- Préparation et hybridation des membranes macro-arrays (A. Berger, V. Pujade-Renaud, D. Garcia / sous-projet 3) pour analyses d'expression des EST-SSH. Ces expérimentations ont été conduites principalement par A. Berger, principalement sur les banques SSH « RO38 » en prolongement du stage de Master de M. Déon (2008), mais aussi, en appui à D. Garcia, pour les banques SSH « MDF180 ». D. Garcia a été accueilli à l'UMR-dap à Montpellier en Juin 2009 pour la réalisation des hybridations de membranes haute-densité réalisées au Brésil.
- 5- Développement de marqueurs EST-SSR (voir ci-dessus « faits marquants », K. Bouchata, V. Pujade-Renaud, M. Seguin / sous-projet 2)
- 6- Validation des gènes candidats par Q-PCR (V. Pujade-Renaud, E. Goujon / sous-projet 3). Dans le cadre d'un stage de Master M1 (Eric Goujon), encadré par V. Pujade-Renaud à Clermont-Ferrand (UM-piaf), l'analyse d'expression par PCR Quantitative (Q-PCR) est mise en œuvre pour une validation complémentaire de gènes candidats identifiés en analyse d'expression par macro-arrays. Les 2 premiers mois de stage ont été consacrés à la mise au point de la technique sur hévéa.
- 7- Evaluations complémentaires de la résistance au champ des descendance de cartographie au Brésil (F. Fonseca, F. Granet / sous-projet 1) : les passages d'observation ont été réalisés sur les plantations de PEM et PMB selon le planning prévu (6 passages sur 2008-2009). Les futures observations (6 autres passages) sont programmées sur 2009-2010.
- 8- Evaluation complémentaire de la résistance de la descendance PB260 x MDF180 en conditions contrôlées en Guyane (F. Doaré / sous-projet 1) : 159 descendants ont été

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

évalués pour la résistance en condition d'inoculations contrôlée à l'aide d'une souche équatorienne de *Microcyclus*. La sensibilité / résistance des individus est mesurée en utilisant les paramètres habituels : Type de Réaction et Diamètre des Lésions.

Une difficulté importante rencontrée dans la gestion du projet est liée à la démission de C. Weber (technicienne de laboratoire, Cirad) au 1^{er} Septembre 2008. Ceci oblige à un report sur des activités de génotypage devant être assurées par C. Weber en 2009. C. Weber était initialement affichée sur le projet pour 0,3 ETP en 2009 et de même en 2010.

F. Etat financier et ressources humaines

Bref descriptif de l'état de consommation des crédits

CIRAD	Crédits consommés (en %)	Commentaire éventuel
Main d'œuvre (tous statuts confondus)	56	
Equipement	-	Pas d'achat d'équipement prévu dans le projet
Mission	37	- Déplacements Arles 2008 ; 2 missions Brésil prévues en 2009 - Missions France – Brésil de 3 agents Cirad, du 28/02 au 12/03/09 (CP GENESALB et Comité Technique CMB)
Fonctionnement/prestations	43	

MICHELIN	Crédits consommés (en %)	Commentaire éventuel
Main d'œuvre (tous statuts confondus)	32	Ce chiffre ne tient compte que des ETPs France. Les modalités d'intégration des dépenses de personnel relatives au Brésil n'étant à ce jour pas définies
Equipement	-	Pas d'achat d'équipement prévu dans le projet
Mission	56	- Déplacements Montpellier/Clermont - Missions France – Brésil, (1 personne en 2008, 2 personnes en 2009)
Fonctionnement/prestations	22	29,4 k€ dépensés sur les 90 k€ de séquençage prévu (33%). Les dépenses de prestations Brésil ne sont pas intégrées dans ce chiffre (possibilités et modalités d'intégration des dépenses relatives au Brésil non définies à ce jour)

En cas de variation supérieure à 30%, d'une ligne par rapport au budget prévisionnel, en donner les éléments justificatifs.

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

Bilan des CDD cumulés depuis le début du projet

	nombre de personnes employées en CDD sur le projet et financées par l'ANR	
	nombre	h-mois cumulés sur tous les partenaires depuis le début du projet
Doctorants	-	
Post-docs	1	0-mois ; recrutement par Michelin au 01/07/09 de Mr Philippe Cubry, sur un contrat post-doc de 18-mois
Ingénieur en CDD	-	
Stagiaires	3	1) 7-mois en 2008, Master 2 : Mlle Marine Déon 2) 3-mois au 1 ^{er} semestre 2009, Master 2: Mlle Karima Bouchata 3) 2-mois au 1 ^{er} semestre 2009, Master 1 : Mr Eric Goujon
Technicien en CDD	1	15-mois (Mme Sandra Espéout-Fois, recrutée par Michelin à compter du 01/04/08)

Commentaire général à l'appréciation du coordinateur, sur l'état d'avancement du projet, les interactions entre les différents partenaires...

Le retard pris dans la réalisation de la cartographie du premier croisement est dû aux problèmes techniques rencontrés au 1^{er} semestre (AFLP). Ces problèmes ont été résolus et le génotypage AFLP est achevé.

Du retard, a également été pris dans la mise en route des opérations de cartographie et d'évaluations phénotypiques des nouvelles descendance car le choix de ces descendance n'a pu être arrêté que tardivement (Août 2008). Ce choix conditionnant la suite des travaux de recherches sur plusieurs années, dans le cadre de GENESALB et au-delà, il nous a paru nécessaire de prendre le temps d'une analyse approfondie des données disponibles.

Suite à la démission de C. Weber, certaines activités de génotypage ont été reportées à 2010. C'est le cas notamment de la cartographie de la descendance PB260 x RO38 « Vietnam ». La demande de renouvellement de ce poste de technicien de l'équipe SRG de l'UMR-dap a été soumise à la direction du Cirad en 2009.

Les autres opérations se déroulent suivant le calendrier prévu. L'implication d'une technicienne de laboratoire (Angélique Berger, Cirad), non prévue initialement dans le projet, permet d'une part la continuité des activités d'analyse d'expression par macro-arrays, suite au départ de V. Pujade-Renaud détachée à l'Université Blaise Pascal à Clermont-Ferrand (voir

Fiche compte- rendu semestriel d'activité

Date : 09/07/2007

Réf.: ANR/

Nombre de pages : 4

les comptes-rendus semestriels précédent, et vient d'autre part en appui à D. Garcia en poste à l'UESC au Brésil.

La coordination du projet est assurée et facilité par des échanges très réguliers, plusieurs fois par mois, entre les responsables d'équipe des 2 partenaires Cirad (M. Seguin) et Michelin (F. Granet). La réunion du CP au Brésil en Mars 2009 a permis une animation scientifique et opérationnelle du projet en présence de la grande majorité des intervenants au projet, et notamment des collègues brésiliens et français en poste au Brésil.

Facultatif : commentaire(s) de partenaire(s)...

Facultatif : question(s) posée(s) à l'ANR...